



УДК 547.962.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА АСПЕРГИЛЛОПЕПСИНА А —  
КАРБОКСИЛЬНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ИЗ *ASPERGILLUS AWAMORI*II\*. АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ХИМОТРИПТИЧЕСКИХ  
ПЕПТИДОВ

*Котлова Е. К., Остославская В. И., Ревина Л. П.,  
Ковалева Г. Г., Сурова Н. А., Левин Е. Д.,  
Тимохина Е. А., Степанов В. М.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики  
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва*

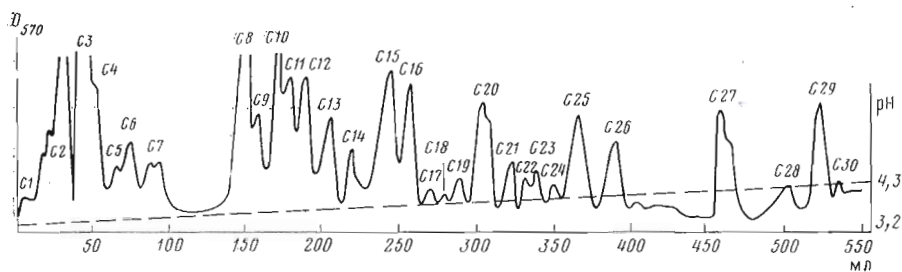
Восстановленный карбоксиметилированный аспергиллопепсин А гидролизовали химотрипсином 4 ч при 37° С и рН 8,0. Растворимую часть гидролизата хроматографировали на сульфополистирольном катионите Хромобедз в градиенте пиридин-ацетатного буфера. Было получено 30 фракций, из них выделено в чистом виде 30 пептидов. Анализ пептидов химотриптического гидролизата позволил установить структуру пептидов, содержащих 57 аминокислотных остатков. Изучение строения пептидов триптического и химотриптического гидролизатов, а также N-концевого района аспергиллопепсина А привело к установлению последовательности в общей сложности 236 аминокислотных остатков.

Данное сообщение, являющееся вторым в серии работ по установлению первичной структуры аспергиллопепсина А — карбоксильной протеиназы микроскопического гриба *Aspergillus awamori*, посвящено изучению пептидов, образующихся при гидролизе этого фермента химотрипсином. Выделение аспергиллопепсина А и исследование пептидов триптического гидролизата описаны в предыдущей публикации [1].

Гидролиз химотрипсином восстановленного карбоксиметилированного аспергиллопепсина А проводили при 37° С и рН 8,0 в течение 4 ч. Подкисление гидролизата до рН 2,5 привело к разделению его на осадок, который содержит смесь труднорастворимых пептидов, образующихся с небольшим выходом и далее не исследовавшихся, и растворимую часть.

Растворимую часть гидролизата хроматографировали на сульфополистирольном катионите Хромобедз (рисунок). Было получено 30 фракций (С1-С30), которые в основном представляли собой смеси пептидов. Для выделения и очистки индивидуальных пептидов использовали хроматографию и электрофорез на бумаге. Недостаточно четко разделявшиеся первые четыре фракции были попарно объединены (С1 с С2 и С3 с С4) и повторно хроматографированы на даэуксе 1×2 в градиенте пиридин-коллидин-ацетатного буфера. Фракции, содержащие трудноразделимые смеси и недостаточное количество пептидного материала, не исследовались. Аминокислотный состав полученных пептидов химотриптического гидролизата приведен в табл. 1.

\* Сообщение I см. [1].



Хроматография химотрипсинового гидролизата восстановленного карбоксиметилированного аспергиллопепсина А на Хромобедзе (колонка 0,6×90 см) в градиенте рН (2,5–4,3) и концентрации пиридин-ацетатного буфера

Как было установлено в ходе дальнейшей работы, аминокислотный состав и отдельные участки последовательности выделенных пептидов совпадают с составом и строением соответствующих участков пептидов триптического гидролизата, изученных ранее. Кроме того, некоторые фрагменты из-за неоднозначности гидролиза химотрипсином перекрываются между собой, поэтому в ряде случаев для установления структуры пептида было достаточно определить лишь несколько аминокислотных остатков.

Для установления строения пептидов мы использовали метод Эдмана в сочетании с дансильрованием, гидролиз карбоксипептидазами А и В, метод Оффорда. Строение всех изученных пептидов приведено в табл. 2. Случаи использования других методических приемов, перекрывания с ранее изученными пептидами триптического гидролизата, особенности полученных пептидов или их выделения оговорены особо.

*Пептид С1-4* выделили хроматографией на дауэксе 1×2 из объединенной фракции С1+С2. По аминокислотному составу и N-концевой аминокислоте (Glx) пептид С1-4 совпадает с пептидом С3-6, выделенным из объединенной фракции С3+С4 на дауэксе 1×2.

*Пептид С3-4* выделили хроматографией на дауэксе 1×2 из объединенной фракции С3+С4. Он состоит из 10 аминокислотных остатков. Судя по его аминокислотному составу и последовательности остатков, занимающих положения 1–4, он полностью совпадает с ранее описанным пептидом Т<sub>1</sub>О-С3-2 триптического гидролизата аспергиллопепсина А [1]. По аминокислотному составу и N-концевой аминокислоте (Ser) пептид С3-4 совпадает с пептидом С1-2, выделенным из объединенной фракции С1+С2.

*Пептид С3-5* выделили хроматографией на дауэксе 1×2 из объединенной фракции С3+С4. Он состоит из 17 аминокислотных остатков. Последовательность 8–17 этого пептида по ряду признаков (совпадение состава и последовательностей участков 8–10 и 15–17) соответствует структуре ранее описанного пептида Т<sub>1</sub>О-С5-2 триптического гидролизата аспергиллопепсина А [1]. С помощью карбоксипептидазы А было показано, что С-концевой аминокислотой в пептиде С3-5 является фенилаланин, которому предшествуют серин и глицин. Их расстановка проведена путем сравнения этого участка с С-концевым районом (положения 8–10) пептида Т<sub>1</sub>О-С5-2, имеющим структуру Ser-Gly-Phe.

*Пептид С6-2-2* состоит из четырех аминокислотных остатков. N-Концевой аланин определен дансильрованием. Аминокислотный состав этого пептида совпадает с составом фрагмента 4–7 триптического пептида Т<sub>1</sub>6-2, причем положение 4 в пептиде Т<sub>1</sub>6-2 занимает аланин. На основании этих данных мы полагаем, что пептид С6-2-2 является фрагментом пептида Т<sub>1</sub>6-2.

*Пептид С8-3* состоит из шести аминокислотных остатков. Аминокислотный состав пептида совпадает с составом фрагмента 2–7 пептида Т<sub>1</sub>О-С10. Последовательность остатков 1–3 в пептиде С8-3 соответствует последовательности 2–4 пептида Т<sub>1</sub>О-С10. Следовательно, пептид отвечает последовательности 2–7 пептида Т<sub>1</sub>О-С10.

Аминокислотный состав химотриптических пептидов аспергиллопепсина А

Аминокислота	Пептид											
	C1-2	C1-4	C3-4	C3-5	C3-6	C6-2-2	C7-3-1	C7-5	C8-2	C8-3	C10-2	C10-4
Asp	1,0(1)	1,8(2)	1,0(1)	3,0(3)	2,0(2)	1,0(1)			1,3(1)	0,3	3,0(3)	
Thr	2,8(3)	0,4	2,8(3)	4,8(5)	1,3(1)	1,8(2)			2,8(3)	2,1(2)	4,6(5)	
Ser	0,8(1)	1,1(1)	1,1(1)	0,4	4,0(4)			1,1(1)	1,9(2)	1,0(1)	2,7(3)	
Glu		4,3(4)	0,3	1,0(1)		1,0(1)			2,1(2)		3,5(3)	1,1(1)
Pro				3,8(4)	2,5(3)				0,8(1)	1,5(1)	2,1(2)	
Gly	1,1(1)	2,7(3)	1,1(1)		1,6(2)	2,5(3)		1,0(1)	0,5		2,4(2)	
Ala	1,9(2)	1,9(2)	1,7(2)		0,7(1)			0,9(1)	1,1(1)		1,3(1)	1,0(1)
Val		1,0(1)							1,0(1)		3,0(3)	1,0(1)
Met				0,9(1)			0,9(1)		0,9(1)	1,0(1)		
Ile	1,0(1)		0,9(1)					1,2(1)			2,0(2)	1,0(1)
Leu	1,1(1)		0,9(1)							1,0(1)	0,9(1)	
Tyr		0,7(1)		0,8(1)	1,2(1)							0,9(1)
Phe				1,9(2)					0,9(1)			
Trp												
His												
Lys												
Arg									0,9(1)		2,0(2)	
Всего остатков	10	14	10	17	14	4	4	4	14	6	27	5
%	6,0	3,0	1,8	7,0	7,0	4,6	1,5	8,2	9,0	35	17	17,0
Выход милломоль	1,0	0,5	0,3	1,2	1,2	0,8	0,3	1,4	1,6	6,0	3,0	3,0
Заряд	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	0

Таблица 1 (продолжение)

Аминокислота	Пептид												
	C11-1-3	C11-2	C12-4	C12-4E-2-2	C13-1	C14-1	C15-1	C16-4	C17-4-1	C19-1	C19-2	C20-1-3	
Asp	2,0(2)	1,1(1)	1,6(2)	1,9(2)	2,0(2)	2,1(1)	1,9(2)			1,0(1)		2,8(3)	
Thr			0,9(1)	0,9(1)	3,0(3)	1,1(1)	1,9(2)		3,2(3)				
Ser	0,3	0,7(1)	1,6(2)	1,6(2)	0,3	2,0(2)	2,9(3)	1,0(1)		1,1(1)		1,0(1)	
Glu			1,1(1)			1,3(1)			2,1(2)	1,1(1)			
Pro	1,0(1)					1,0(1)	1,0(1)		1,3(1)	0,9(1)			
Gly	1,9(2)	1,2(1)	1,0(1)		2,3(2)	0,4		1,0(1)	0,5	1,9(2)		1,1(1)	
Ala			1,0(1)	1,0(1)					1,1(1)				
Val		1,0(1)			3,2(3)	0,7(1)			1,0(1)		1,0(1)		
Met													
Ile		0,9(1)								0,9(1)		0,9(1)	
Leu		1,1(1)				2,0(2)	0,9(1)					1,8(2)	
Tyr	0,8(1)		0,9(1)					0,9(1)					
Phe	1,1(1)	0,9(1)				1,0(1)			2,1(2)	1,0(1)		1,0(1)	
Trp			+ (1) *										
His													
Lys													
Arg					1,0(1)	0,7(1)	0,9(1)		1,0(1)	0,9(1)		1,0(1)	
Всего остатков	7	7	10	6	11	11	9	3	11	9	2	10	
Выход % мкмоль	3,5	9,0	23,0	-	8,0	3,5	23,0	29,0	1,0	12,0	16,0	4,8	
Заряд	0,6	1,5	4,0	-	1,3	0,6	4,0	5,0	0,2	2,0	2,8	0,3	
	0	-	-3	-2	-	-	-	-	-	-	-	-	

Пептид

Аминокислота	C22-2	C23-3	C23-3E-2-1	C23-3E-2-2	C23-3E-4	C23-3E-5	C24-2	C25-3	C26-1	C27-4	C28-2	C29-1	C30
Asp		2,1(2)		1,1(1)	1,1(1)				2,5(3)			1,1(1)	
Thr		1,0(1)	0,9(1)		4,6(2)		1,0(1)	2,8(3)	1,1(1)	1,1(1)		1,1(1)	
Ser		2,7(3)	0,8(1)		1,2(1)		1,1(1)	2,8(3)	1,0(1)	1,3(1)	1,3(1)	1,1(1)	
Glu		2,2(2)	1,2(1)		4,0(1)								
Pro	1,4(1)	4,1(1)		4,0(1)								1,0(1)	1,0(1)
Gly	1,2(1)	1,1(1)							1,1(1)		1,3(1)	1,2(1)	1,0(1)
Ala	1,1(1)	1,1(1)			1,1(1)			2,5(3)	1,1(1)			1,0(1)	1,0(1)
Val	1,1(1)	1,9(2)			1,1(1)	1,1(1)		0,9(1)				0,9(1)	1,2(1)
Met	1,0(1)												
Ile							0,8(1)	0,9(1)	1,9(2)	1,0(1)	1,0(1)	0,8(1)	0,8(1)
Leu		1,0(1)			1,1(1)								
Tyr	0,9(1)	0,9(1)			1,0(1)	1,0(1)				0,8(1)	0,9(1)		
Phe		1,0(1)			1,0(1)			1,0(1)	1,0(1)				
Trp													
His		1,0(1)		0,9(1)					0,7(1)			0,9(1)	
Lys	1,0(1)						0,8(1)	1,8(2)		1,0(1)	0,8(1)	0,9(1)	1,5(2)
Arg		1,0(1)	1,0(1)										
Всего остатков	7	17	4	3	8	2	4	14	12	5	5	8	7
%	2,9	20,0					2,9	2,9	11,0	9,0	2,9	12,0	18,0
Выход	0,5	3,5					0,5	0,5	1,9	1,5	0,5	2,0	3,0
Заряд	-	-	0	0	-2	-	+1**	-	-	+1**	-	-	-

\* Триптофан определен методом Эрлиха.  
 \*\* По данным электрофореза при pH 5,6.

## Аминокислотная последовательность химотриптических пептидов аспергиллопепсина А

Пептид	Последовательность
C1-4	Glx-Glx-Val-Asx-Gly-Gly-Glx-Asx-Ser-Gly-(Ala, Glx, Ala)-Tyr
C3-4	Ser-Ala-Ile-Ala-Asp-Thr-Gly-Thr-Thr-Leu
C3-5	Gly-Phe-Asx-Pro-Asx-Gly-Tyr-Ser-Ile-Gly-Asp-Ser-Ser-Ser-Ser-Gly-Phe
C6-2-2	Ala-Ala-Gln-Ala
C7-3-1	Ser-Ser-Ile-Asn
C7-5	Ala-Val-Gln-Leu
C8-2	Ser-Ser-Ile-Asn-Thr-Val-Gln-Pro-Lys-Ala-Gln-Thr-Thr-Phe
C8-3	Thr-Gly-Ser-Ile-Thr-Tyr
C10-2	Ser-Lys-Gly-Ser-Ala-Val-Thr-Thr-Pro-Gln-Asn-Asn-Asp-Gly-Gly-Tyr-Leu- -Thr-Pro-Val-Thr-Val-Gly-Lys-Ser-Thr-Leu
C10-4	Phe-Ala-Val-Gln-Leu
C11-1-3	Gly-Phe-Asx-Pro-Asx-Gly-Tyr
C11-2	(Gly, Ser, Asx, Ile, Leu)-Val-Phe
C12-4	Thr-Asn-Ala-Asn-Ser-Ser-Glx-Gly-Tyr-Trp
C13-1	Arg-Asn-Thr-Val-Thr-Val-Gly-Gly-Val-Thr-Asn
C14-1	Phe-Asn-Thr-Val-Lys-Ser-Gln-Leu-Asn-Ser-Pro-Leu
C15-1	Thr-Pro-Ser-Ser-Ser-Ala-Thr-Lys-Leu
C16-4	Ser-Gly-Tyr
C17-4-1	Thr-Val-Gln-Pro-Lys-Ala-Gln-Thr-Thr-Phe-Phe
C19-1	Asx-Ser-Glx-Gly-Pro-Lys-Leu-Gly-Phe
C19-2	Val-Phe
C20-1-3	Asx-Phe-Gly-Tyr-Ile-Asx-(Asx, Ser)-Lys-Tyr
C22-2	Lys-Ala-Val-Gly-Pro-X-Tyr
C23-3	Val-Phe-Ser-Asp-Glu-Leu-Pro-Ser-Ser-Glu-Arg-Thr-Gly-His-Asn-Val-Tyr
C24-2	Leu-Lys-Ser-Gln
C25-3	Lys-Glx-Ala-Val-(Glx <sub>2</sub> , Ala <sub>2</sub> , Ser <sub>3</sub> , Ile, Lys)-Phe
C26-1	His-Leu-Asx-Phe-Asp-Thr-Gly-Ser-Ala-Asx-Leu-Trp
C27-4	Leu-Lys-Ser-Gln-Tyr
C28-2	Lys-Leu-Ser-Gly-Tyr
C29-1	Lys-His-Asx-Ala-Pro-Gly-Val-Tyr
C30	Lys-Ala-Val-Gly-Pro-Lys-Tyr

Обозначения: ← определена отщеплением карбоксипептидазой А, → определена методом Эдмана в сочетании с дактилированием, ← определена отщеплением карбоксипептидазами А и В, — отщеплена по методу Эдмана, по идентифицирована другим методом, указанным в соответствующей части обсуждения.

*Пептид С10-2* состоит из 27 аминокислотных остатков, его N-концевой аминокислотой является серин. Карбоксипептидаза А отщепляет от пептида по одному остатку лейцина, серина и треонина. Его состав совпадает с составом участка 1—27 аспергиллопепсина А (по данным, полученным автоматическим методом Эдмана), совпадают также и последовательности 3—9 пептида С10-2 и N-концевого района аспергиллопепсина А. Следовательно, пептид С10-2 является N-концевым фрагментом аспергиллопепсина А.

*Пептид С10-4* содержит пять аминокислотных остатков. Его состав совпадает с составом участка 8—12 триптического пептида Т<sub>2</sub>5-6. Кроме того, последовательность остатков 11—12 Gln-Leu, определенная в пептиде Т<sub>2</sub>5-6 при помощи гидролиза карбоксипептидазой А, совпадает с последовательностью 4—5 пептида С10-4. По данным электрофореза по Оффорду, пептид С10-4 нейтрален и, следовательно, содержит остаток глутамина, что в свою очередь подтверждает результаты гидролиза пептида Т<sub>2</sub>5-6 карбоксипептидазой А.

*Пептид С11-1-3*. Состав этого пептида, состоящего из семи аминокислотных остатков, совпадает с составом участка 1—7 пептида С3-5, описанного выше. Последовательность 1—2 в обоих пептидах занимают остатки Gly-Phe. На основании этих результатов мы полагаем, что пептид С11-1-3 является частью пептида С3-5.

*Пептид С11-2* состоит из семи аминокислотных остатков и имеет С-концевую последовательность Val-Phe. N-Концевую аминокислоту определить дансилированием не удалось.

*Пептид С12-4* состоит из 10 аминокислотных остатков и, судя по составу и последовательности, совпадает с ранее изученным пептидом Т<sub>1</sub>0-С8-1. Методом Оффорда было установлено, что в пептиде содержится три остатка дикарбоновых аминокислот. Для уточнения этих данных пептид последовательно гидролизовали термолизином и эластазой (с целью обеспечения достаточной полноты гидролиза). Полученный N-концевой гексапептид С12-4Е-22 содержит две дикарбоновые аминокислоты, что установлено методом Оффорда.

*Пептид С13-1* состоит из 12 аминокислотных остатков, N-концевой аргинин определен субтрактивным методом Эдмана. Судя по составу и последовательности, пептид С13-1 совпадает с участком 1—10 пептида Т<sub>2</sub>5-2-1, описанного ранее [1]. Пептид С13-1 образовался при расщеплении связи Asn-Thr, не характерной для специфичности химотрипсина.

*Пептид С14-1* состоит из 12 аминокислотных остатков, его последовательность 1—5 совпадает с участком 6—10 ранее описанного пептида Т<sub>2</sub>5-8 [1]. Состав фрагмента 6—12 пептида С14-1 совпадает с составом участка 1—7, а последовательность 6—8 — с последовательностью 1—3 триптического пептида Т<sub>2</sub>5-6 [1].

*Пептид С15-1* состоит из девяти аминокислотных остатков. Последовательность 1—8 этого пептида совпадает с последовательностью 7—14 триптического пептида Т<sub>2</sub>5-9 [1].

*Пептид С17-4-1* состоит из 11 аминокислотных остатков. В процессе установления его последовательности методом Эдмана остатки 4 и 5 идентифицировать не удалось. Структура С-концевого участка 7—10 совпала с последовательностью 2—6 ранее изученного пептида Т<sub>2</sub>5-8 [1]. При сравнении пептидов С17-4-1 и Т<sub>2</sub>5-4-1 [1] обнаружено совпадение состава участков 1—5 пептида С17-4-1 и 5—9 пептида Т<sub>2</sub>5-4-1, а также перекрывание последовательностей 1—2 пептида С17-4-1 и 5—6 пептида Т<sub>2</sub>5-4-1. Поскольку С-концевой аминокислотой в пептиде Т<sub>2</sub>5-4-1 является лизин, то, принимая во внимание отмеченное выше перекрывание последовательностей, мы считаем, что положение 5 в пептиде С17-4-1 также занимает лизин. Таким образом, в положении 4 этого пептида может находиться только пролин. Пептид С17-4-1 содержит два остатка глутаминовой кислоты или глутамина. Ранее при изучении пептида Т<sub>2</sub>5-8 было установлено,

что в его состав входит глутамин, занимающий в этом пептиде положение 2. Поскольку положение 2 пептида T<sub>2</sub>5-8 совпадает с положением 7 пептида C17-4-1, а с помощью карбоксипептидазы А также было показано, что в положении 7 находится глутамин, можно считать доказанным двумя независимыми способами присутствие глутамина в положении 7 пептида C17-4-1. Этот пептид при электрофорезе на бумаге при pH 5,6 вел себя как вещество основного характера, что могло быть лишь при наличии в нем двух остатков глутамина. Поэтому мы считаем, что и положение 3 пептида C17-4-1 занято глутамином.

*Пептид C19-1* состоит из девяти аминокислотных остатков. Последовательность 1—5 определена методом Эдмана в сочетании с дансильрованием. С-Концевая последовательность, определенная гидролизом карбоксипептидазой А, совпадает с последовательностью 1—3 ранее описанного пептида T<sub>1</sub>6-2; следовательно, остаток лизина в пептиде C19-1 занимает положение 6.

*Пептид C22-2* содержит семь аминокислотных остатков, в том числе один остаток лизина. При аминокислотном анализе этого пептида на хроматограмме был обнаружен пик, занимающий положение метионина в контрольном опыте. Однако после окисления пептида надмуравьиной кислотой и последующего гидролиза пик не исчез и, таким образом, он не отвечает присутствию метионина в пептиде. Следует приять во внимание и то, что в составе аспергиллопепсина А метионина нет. Так как по составу и частично определенной последовательности пептид C22-2 близок к пептиду C30 (см. табл. 1 и 2), содержащему два остатка лизина, можно предположить, что пик на хроматограмме говорит о наличии в нем модифицированного остатка какой-то аминокислоты, скорее всего карбоксиметилированного лизина.

*Пептид C23-3* состоит из 17 аминокислотных остатков. Последовательность 1—10 совпадает с последовательностью 16—25 пептида T<sub>1</sub>3, описанного ранее [1], последовательность 15—17, определенная гидролизом карбоксипептидазой А, совпадает с последовательностью 4—6 пептида T<sub>2</sub>5-9 [1]. Пептид содержит четыре остатка дикарбоновых аминокислот или их амидов. Как и в случае пептида C12-4, для их идентификации получали более короткие фрагменты, последовательно расщепляя пептид термолизином и эластазой. Анализ образовавшихся пептидов, содержащих остатки 1—8 (пептид C23-3E-4), 9—12 (пептид C23-3E-2-1) и 13—15 (пептид C23-3E-2-2), показал, что во фрагментах 1—8 и 9—12 находятся остатки дикарбоновых аминокислот со свободными карбоксильными группами (соответственно два и один), а фрагмент 13—15 содержит аспарагин.

*Пептид C26-1* состоит из 12 аминокислотных остатков. N-Концевой остаток идентифицировать дансильрованием не удалось. Последовательность 2—12 этого пептида совпадает с участком 5—15 ранее изученного пептида T<sub>1</sub>3 [1]. По данным аминокислотного анализа, в пептиде C26-1 содержится один остаток гистидина. Так как положение остальных 11 остатков было установлено, мы считаем, что место неидентифицированной N-концевой аминокислоты занимает гистидин.

*Пептид C28-2* состоит из пяти аминокислотных остатков. N-Концевой остаток определить дансильрованием не удалось, однако, по данным аминокислотного анализа, пептид содержит один остаток лизина, не обнаруженного в последующих положениях; следовательно, остаток лизина занимает N-концевое положение.

*Пептид C29-1* состоит из восьми аминокислотных остатков. Остатки лизина и гистидина в нем определены субтрактивным методом Эдмана.

*Пептид C30* состоит из семи аминокислотных остатков. N-Концевой лизин определен субтрактивным методом Эдмана. Участок 2—6, судя по составу и остаткам 2, 3 и 6, совпадает с пептидом триптического гидролизата T<sub>1</sub>6-1 [1].



Таким образом, изучены 30 пептидов химотриптического гидролизата восстановленного карбоксиметилированного аспергиллопепсина А.

Анализ пептидов химотриптического гидролизата позволил впервые установить структуру пептидов, содержащих 57 аминокислотных остатков; идентифицировать остатки дикарбоновых аминокислот, их амидов; получить перекрывающиеся пептиды С23-3, С17-4-1, С14-1, С3-5, С19-1 и подтвердить положения 129 аминокислотных остатков из 169, входящих в состав последовательностей, установленных ранее [1].

Изучение строения пептидов триптического и химотриптического гидролизатов, а также N-концевого района аспергиллопепсина А привело к установлению последовательности в общей сложности 236 аминокислотных остатков.

### Экспериментальная часть

В работе использовали химотрипсин и карбоксипептидазы А и В (Worthington, США), эластазу (Serva, ФРГ), термолизин (Merck, ФРГ), диметиламинонафтилсульфохлорид (дансилхлорид) (Fluka, Швейцария), смолу Хромобедз Туре Р, 2-1-01-18 (А) Т2 15-03-58-04 (Ирландия).

*Денатурацию аспергиллопепсина А* проводили по методике, приведенной в работе [1].

*Восстановление и карбоксиметилирование аспергиллопепсина А* осуществляли в соответствии с методикой [2].

*Гидролиз восстановленного карбоксиметилированного аспергиллопепсина А химотрипсином.* 600 мг (17 мкмоль) восстановленного карбоксиметилированного аспергиллопепсина А растворяли в 200 мл триэтиламинкарбонатного буфера, рН 8,0. Добавляли 6 мг химотрипсина в 1 мл воды и вели гидролиз 4 ч при 37° С. Затем гидролизат подкисляли 50%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  до рН 2,5 и лиофильно высушивали. Остаток растворяли при перемешивании в 4 мл 0,1 М пиридин-ацетатного буфера, рН 2,5, затем центрифугировали; осадок промывали тем же буфером (2 мл×2).

*Разделение пептидов на смоле Хромобедз* проводили как описано ранее [1].

*Разделение пептидов на дауэксе 1×2.* Парно объединенные фракции С1 и С2, а также С3 и С4 растворяли в 1 мл пиридин-коллидин-ацетатного буфера, рН 8,46 (1% пиридин+1% коллидин доводили  $\text{CH}_3\text{COOH}$  до рН 8,46), добавляли 0,2 мл 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$  и 50 мг мочевины. Наносили на колонку с дауэксом 1×2 (0,9×64 см), уравновешенную тем же буфером. Хроматографию вели при 37° С в линейном градиенте пиридин-коллидин-ацетатного буфера, скорость элюции 7 мл/ч. После того как было собрано 300 мл элюата, второй компонент градиента сменили на 0,5 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , а еще через 300 мл — на 2 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Затем колонку промыли 50%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Собирали фракции по 2,5 мл.

*Обнаружение пептидсодержащих фракций* проводили на пептидном анализаторе фирмы «Technicon» АА-11 [3].

*Гидролиз термолизином* проводили в триэтиламинкарбонатном буфере, рН 8,4, в течение 24 ч при 37° С и фермент-субстратном соотношении 1:50; гидролиз эластазой — так же, но в течение 6 ч.

*Исследование строения пептидов.* Очистку пептидов, определение C-концевых аминокислот, N-концевых аминокислот методом дансирования, определение последовательности аминокислот методом Эдмана в сочетании с дансированием проводили как описано ранее [1].

*Полиамидные пленки* готовили по методике [4].

*Остатки дикарбоновых аминокислот и их амидов идентифицировали* электрофорезом при рН 6,5 по методу Оффорда [5].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ковалева Г. Г., Остославская В. И., Сурова И. А., Ревина Л. П., Котлова Е. К., Немцова Е. Р., Левин Е. Д., Тимохина Е. А., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Степанов В. М. (1980) Биоорг. химия, 6, 1765-1777.
2. Левин Е. Д., Егоров Ц. А., Степанов В. М. (1965) Изв. АН СССР. Сер. хим., 825-831.
3. Lin K. D., Deutsch H. F. (1973) *Analyt. Biochem.*, 56, 155-164.
4. Решетов П. Д., Честухина Г. Г., Махмудов С., Пышкин А. С. (1971) Химия природн. соедн., № 1, 66-68.
5. Offord R. E. (1966) *Nature*, 211, 591-595.

Поступила в редакцию

11.II.1980

После доработки

4.IV.1980

### THE PRIMARY STRUCTURE OF ASPERGILLOPEPSIN A — A CARBOXYLIC PROTEINASE FROM *ASPERGILLUS AWAMORI*. II. AMINO ACID SEQUENCES OF CHYMOTRYPTIC PEPTIDES

KOTLOVA E. K., OSTOSLAVSKAYA V. I., REVINA L. P.,  
KOVALEVA G. G., SUROVA I. A., LEVIN E. D.,  
TIMOKHINA E. A., STEPANOV V. M.

*Institute for Genetics and Selection of Industrial  
Microorganisms, Moscow*

Reduced and carboxymethylated aspergillopepsin A was hydrolyzed with chymotrypsin (100:1 substrate-enzyme ratio) at pH 8,0 and 37° C. Soluble peptides were separated by ion-exchange chromatography on a sulfopolystyrene resin «Chromobeads» using a gradient of pyridine-acetate buffer. Additional purification by paper chromatography or paper electrophoresis gave 30 peptides, which were analyzed by manual Edman procedure. Analysis of chymotryptic peptides allowed to elucidate the sequence of 57 amino acid residues. These data, along with those on tryptic peptides and sequencing of the enzyme N-terminal region, gave the information on the sequence of, in total, 236 amino acid residues.